

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公告

⑪ 特許公報 (B2)

平5-44930

⑤ Int.CI.

A 61 K 37/66

識別記号

A B G C

庁内整理番号

8317-4C

⑫ ⑬ 公告 平成5年(1993)7月7日

発明の数 1 (全6頁)

④ 発明の名称 ヨーインタフェロン (Y-INFN) を含有するリューマチ症治療剤

⑤ 特願 昭60-188689

⑥ 公開 昭61-91135

⑦ 出願 昭60(1985)8月29日

⑧ 昭61(1986)5月9日

優先権主張

⑨ 1984年10月5日 @ 西ドイツ (DE) @ P3436638.5

⑩ 1985年6月18日 @ 欧州特許機構 (EP) @ 85107490.6

⑪ 発明者

ヨハン フリードリッヒ フォン アイヒボルン ドイツ連邦共和国、デー-7901 ヒュッティンゲン、ハムランゲン 6番

⑫ 発明者

フランツ リンク ドイツ連邦共和国、デー-8403 バッド アツバッハ、アム コーレンシャクト 5番

⑬ 発明者

ハンス ヨアヒム オベルト ドイツ連邦共和国、デー-7959 バルグリーデン、バルグシュトラーセ 3番

⑭ 出願人

ビオフェロン ビオヒエミシエ サブスタンツエン ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング ウント コムバニー ドイツ連邦共和国、デー-7958 ラウプハイム 1、インダストリエゲビート (無番地)

⑮ 代理人

弁理士 浜田 治雄

審査官

松浦 新司

⑯ 参考文献

特開 昭58-77824 (JP, A)

特開 昭59-134735 (JP, A)

1

2

⑰ 特許請求の範囲

- 1 ヨーインタフェロンを含有するリューマチ症治療剤。
- 2 炎症性リューマチ症を治療する特許請求の範囲第1項記載の治療剤。
- 3 慢性多発関節炎 (リューマチ様関節炎) を治療する特許請求の範囲第2項記載の治療剤。
- 4 若年性慢性関節炎を治療する特許請求の範囲第2項記載の治療剤。
- 5 乾癥性関節炎を治療する特許請求の範囲第2項記載の治療剤。
- 6 関節外リューマチ症 (軟部リューマチ症) を治療する特許請求の範囲第1項記載の治療剤。
- 7 筋肉リューマチ症および上腕肩胛骨関節周囲

炎を治療する特許請求の範囲第6項記載の治療剤。

8 変性リューマチ症を治療する特許請求の範囲第1項記載の治療剤。

5 9 紅斑性狼瘡を治療する特許請求の範囲第1項記載の治療剤。

10 皮膚筋炎を治療する特許請求の範囲第1項記載の治療剤。

11 硬皮症を治療する特許請求の範囲第1項記載の治療剤。

12 ヨーインタフェロンをヒト細胞によりまたは遺伝子工学的方法により生産することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の治療剤。

13 ヨーインタフェロン含有治療剤に加え、他

のインタフェロンおよび／または白血球により生成されもししくは遺伝子工学的方法により生成された他の細胞媒体をも含有することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の治療剤。

14 静脈内、筋肉内、関節内、関節液内、骨膜内、皮下、皮内、莢膜内、口径的または局部的経路にて投与する投与形態であることを特徴とする特許請求の範囲第1項～第11項のいずれかに記載の γ -インタフェロン含有の治療剤。

15 ポリペプチド治療剤につき知られた投与形態である特許請求の範囲第14項記載の治療剤。

16 投与される個々の投与量が200国際基準単位(I.E.)～2000000I.E(約20ng～20mgに相当)の γ -インタフェロンを含有することを特徴とする特許請求の範囲第1項～第15項のいずれかに記載の γ -インタフェロン含有の治療剤。

発明の詳細な説明

〔発明の属する技術分野〕

本発明は、 γ -インタフェロンを含有するリューマチ症治療剤に関するものである。

〔従来技術とその問題点〕

全ての公知インタフェロンは、その構造遺伝子のヌクレオチド配列間のみならず、そのアミノ酸配列間の同族性に基づいて3つの群(すなわち α -IFN, β -IFNおよび γ -IFNと呼ばれる3つの群)に明確に分類される。

使用する用語は、ジェー・ビルセク(1983)によりアーチベス・オブ・バイロロジー、第77巻、第283～285頁に開示された「インタフェロン命令委員会」の最新の提案にしたがつている。上記の主たる基準に加え、 γ -IFN群を特性化するには、他の両IFN群に対する免疫学的交鎖反応を示さず、かつ α -IFNおよび β -IFNと異なりPH2において生物学的に不安定である点を挙げることができる。

γ -IFNは免疫系のT-リンパ球による複雑な過程でミトゲンまたは特定抗体での刺戟に際し1群の他のファクター(媒体)と共に放出され、したがつて同時にリンホキントも称せられる。さらに、 γ -IFNを構成的に產生する従来存在する同定されたまたは形質転換された細胞ラインは、たとえばエヌ・フジイ等によりジャーナル・イミュノロジー、第130巻、第1683～1686頁およびエー・ツロトニク等によりジャーナル・イミュノロ

ジー、第131巻、第794～800頁に記載されている。

ヒト粗製 γ -IFNを得るための好適な方法は次のように記載されている。出発物質としては保存血液のリンパ球リッチな血漿フラクション(いわゆる「バッファーコート」)を使用し、これを集めて600～800mlにおける慎重な遠心分離により血漿残渣から分離する。ペレット化した全白血球を予備加温された媒体中へ細胞5000000個/mlの密度にて懸濁させる。この細胞懸濁物を、それぞれ

5 適当な培養容器においてミトゲン(たとえばフィトヘマグルチニン)およびホルボルエステル(たとえばホルボルミリスチル酢酸)(PMA)の添加後に37℃にて振とう機で70時間培養する。 γ -インタフェロン含有の培養物を遠心分離によって回収し、これを後に使用するまで4℃にて貯蔵することができる。通常、このように得られた調製物は約10000国際基準単位の γ -IFNを1ml当たりに含有する。

20 γ -IFN含有量は、適当な標識細胞(たとえばWISH)におけるCPE-減少試験により試験ウイルス(たとえば、ネズミのEMC)を用いてナシヨナル・インスティチュート・オブ・ヘルス(USA)の基準法Gg23-901-530にしたがい調製物の抗ウイルス活性として測定される。

25 γ -IFN調製物を得るための他の方法は、ワイ・ケー・イップ等により「感染および免疫」(1981年10月)第34巻、第131～133頁および米国特許第4376821号、第4376822号および第4460685号各公報に記載されている。

30 ヒト γ -IFN調製物を得るための他の基本的方法は、適当なベクターによりヒト構造遺伝子を異質宿主細胞に組み込むことからなっている。この組換遺伝子を、構成的にまたは特定誘発剤の添加の後に宿主細胞により発現させる。さらに、誘導

35 されうるアミノ酸配列の合成を必然的にもたらすような明確に規定されたヌクレオチド配列が構造遺伝子において問題となる場合、 γ -IFN分子(すなわち宿主細胞により生成される調製物)は必ずしも天然に生成する γ -IFNとは同一でない。「後処理」により特定作用を得る際のこの変動の可能性は、いわゆる蛋白質設計により拡大され、これにより構造遺伝子は化学的または生化学的な完全合成または改変により変化されうる。

ヒト遺伝子を組み込むための宿主細胞として

は、細菌（たとえば、ジー・シモンス等によりジーン、第28巻、第55-64頁（1984）に記載されたようなイー・コリ）の他に酵母（たとえば、アル・デリンク等によりヌクレオソーム・アシッド・リサーチ、第11巻、第1819-1837頁（1983）に記載されたようなサツカロミセス・セレビシイ）または真核細胞（たとえば、エス・ジエー・スカヒル等によりプロシーディング・アカデミック・サイエンス・USA、第80巻、第4654-4658頁（1983）或いはピー・ダブリュー・グレー等によりネーチャー、第295巻、第503-508頁（1982）に記載されたような支那ハムスターの卵細胞）を使用することができる。

これら幾つかの系において γ -IFNは培養液中に1 μ g当り100000国際基準単位以上の濃度まで濃厚化するか、或いは宿主自身において濃厚化して細胞の蛋白質含有量に対し25%まで蓄積する。

上記方法により得られる γ -IFN調製物の濃厚化または精製は、次の方法により個々にまたは組み合せて行なうことができる：

- 1 調節多孔質ガラス（CPG）またはシリカゲル、
- 2 ゲル通過（たとえばAcA54またはセファセルS200）、
- 3 イオン交換クロマトグラフィー（CM-セファロースまたはホスフォセルロースまたはDEAE-セルロース）、
- 4 親和性クロマトグラフィー（Con A-セファロースまたはポリ-U-セファロースまたはCu-キレート-セファロース）、
- 5 免疫親和性クロマトグラフィー（抗- γ -IFN-セファロース）、
- 6 HPLC（たとえば逆転相物質）。

対応の方法はワイ・ケー・イツプ等によりプロセーディング・ナショナル・アカデミー・サイエンス・USA、第78巻、第1601-1605頁（1981）における「ヒト γ （免疫）インターフェロンの部分精製および特性化」に記載され、或いはデー・ノビツク等によりEMBOジャーナル、第2巻、第1527-1530頁（1984）またはドイツ特許第3136166 A1号公報に記載されている。

適当な組み合せにより電気泳動的な均一性まで精製することが可能であり、その際得られる最高の比活性は100000000~200000000国際基準単位で

あり、また平均的数値は10000000~50000000国際基準単位である。蛋白質1 μ g当たり100000~200000000国際基準単位を含有する（すなわち、1 μ gの活性物質は200000国際基準単位までを含有する）通常の調製物が臨床的に使用される。

他のインターフェロンと同様に、 γ -IFNも抗ウイルス、増殖防止および免疫変性の作用を有する物質である。インビトロにおける強力な増殖防止作用に基づき、 α -IFNおよび β -IFNと同様に、これは従来殆んど専ら悪性症状を有する患者においてのみ使用された〔ピー・イー・ケイムおよびダブリュー・エー・カーター、「インターフェロンおよびその用途」、スプリンガー出版、ベルリン・ハイデルベルグ、ニューヨーク、トーキヨー（1984）；イー・デマイヤーおよびエツチ・シエレンケン（Hrsg.）、「インターフェロン系の生物学」（1983）、エルセvier・サイエンス出版社、アムステルダム、ニューヨーク、オックスフォード（1983）〕。

リューマチにおいては運動器管における疼痛および機能障害が問題となる〔エツチ・マチエス、「リューマチ質」、グスタフ・フィッシャー出版、ストットガルト、ニューヨーク（1983）〕。診断-治療-臨床の観点によれば、次のように種々様々である：炎症性リューマチ症、変性リューマチ症および関節外リューマチ症。リューマチ症の病状についてはさらに次のものが挙げられる：全身紅斑性狼瘡、進行性全身硬皮症、皮膚筋炎、結節性動脈周囲炎、尿酸関節炎および石灰性軟骨炎〔ダブリュー・ブシレンベル、「クリニツヒエ・ベルテルブーフ」、ワルター・デ・グリツター、ベルリン、ニューヨーク（1982）〕。炎症性リューマチ症につき挙げられる慢性関節炎の場合、子供や若年層に生ずる形態はしばしば成人におけるものとは異なる〔ピー・エム・アンツエル、「若年性慢性多発関節炎」、Arthr.Rheum.Supp., 第20巻、第176-180頁（1977）；エツチ・トルケンプロット、「若年性慢性関節炎およびその亜型」、Münch.med.Wschr. 第126巻、第1076-1078頁（1984）〕。

殆んど大抵のリューマチ症患者の病原は明らかでないので、一般に原因療法は使用できない〔ケー・クリーガー、「リューマチ学における新たな治療原理」、Münch.med.Wschr. 第126巻、第

1084-1086頁(1984)】。薬物投与治療においては各種の薬剤が使用され、これらは2つの群に分類することができる。すなわち迅速であるが薬剤が摂取される間のみ作用するたとえばサリチル酸、インドメタシンおよびグルココルチコイドのような対症抗リューマチ剤、および病原を捕えて治療開始後2~3週間で作用が現われるが、その効果が投薬停止後にも数時間持続する、たとえば金塩、D-ペニシルアミン、クロロキンおよび免疫抑制剤のような基礎抗リューマチ剤である〔エッチ・マチエス、アール・シー・バトラーおよびディー・エッチ・ゴッドアルト、「リューマチ様関節炎の治療における検討」、ランセット、第II巻、第278-279頁(1984)〕。

α -IFNを用いて行なわれる治療は、リューマチ様関節炎に対しては無効であった〔エー・カジヤンダール等、「リューマチ様関節炎のインターフェロン治療」、ランセット、第I巻、第984頁(1979)〕。この結果は、驚くに当たらない。何故なら、リューマチ様関節炎を含め或る種のリューマチ症患者においては、内生インターフェロンが生成され、これは治療上全く作用を示さず、或いはこれら患者の病原につき同罪にさえなりうるからである〔ジエー・ジエー・フックス等、「自家免疫病を有する患者の循環系における免疫インターフェロン」、N Engl J Med、第301巻、第5~8頁(1979); オー・ティー・ブレブル等、「全身紅斑性狼瘡：酸感受性の異常白血球インターフェロンのヒト血清における存在」、サイエンス、第216巻、第429-431頁(1982); エム・デグレ等、「リューマチ様関節炎および関連障害における血清および滑液中の免疫インターフェロン」、アニュアル・リューマティック・ディスクツーション、第42巻、第672-676頁(1983); エー・エム・アービンおよびジエー・ジエー・ミラー、「若年性関節炎を有する患者からの血清および滑液における酸感受性の α -インターフェロン」、アルスリチス・アンド・リューマチズム、第27巻、第582-585頁(1984); ティー・オー・ローゼンバッハ等、「インターフェロンは実験滑膜炎を惹起し、ヒトにおける自家免疫病を誘発する」、クリニカル・リュマトロジー、第3巻、第361-364頁(1984)〕。

幾つかの臨床検査において、種々のリューマチ症患者の治療に際し、天然 γ -インターフェロンの

みならず組換 γ -インターフェロンを含有する調製物も少量注射すると疼痛を持続的に除去すると共に、患者の運動性を著しく改善することが予期せずに見い出された。 γ -インターフェロンは、炎症性リューマチ症(実施例1~3)、関節外リューマチ症(実施例4および5)および変形リューマチ症(実施例6)において治療上有効であった。從来臨床上確認されたインターフェロンの作用からは推測されず、かつこの種の病気においてインターフェロンは逆作用があるとも見られていたので、上記効果は驚異的である。

本発明の目的は、 γ -インターフェロンを含有するリューマチ症治療剤を提供することである。

【課題を解決するための手段】

15 上記の目的を達成するために、本発明の治療剤は、天然 γ -インターフェロン(γ -IFN)および組換 γ -IFNからなる γ -インターフェロンを含有する。

天然 γ -IFNおよび組換 γ -IFNは次のように
20 投与することができる。丸薬として、或いは24時間までの持続灌流としての静脈内投与、筋肉内(脊髄内および関節周囲を含む)、滑液内、関節内、骨膜内、皮下、皮内、莢膜内、経口もしくは局部的な経路で、たとえば軟膏もしくはゲル基剤
25 において皮膚への塗布或いは皮膚中への浸透により投与することができる。これら投与形態において、さらに当業者に周知された投与形態物を使用することもできる。

全ての投与に際し、患者の症状程度にしたがい
30 每日または数日にわたり1回もしくは数回に分割して、200国際単位(I.E.)~2000000国際単位の量で投与される。数日間の投与に対しては1回もしくはそれ以上の投与量は次のように投与することができる:

- 35 (a) 每日連続して、
- (b) 2~6日間全部、
- (c) 1週間に1回、
- (d) 2~4週間全部、
- (e) 1ヶ月に1回、または
- (f) 疼痛が発生した都度。

← α -IFNを用いて
次には γ -IFNかこれある

実際の使用については、たとえば20000~2000000 I.E.(すなわち約2~200 μ g)の γ -IFNという少量の投与量による試料から開始することが推奨される。

$$10^4 \text{ u} = 1 \mu\text{g}$$

γ-インターフェロン調製物の効果を高めるには、次の物質をさらに添加することができる：

(a) 他のインターフェロンおよび／または白血球により生成されもししくは遺伝子工学法により生成された他の細胞媒体、

(b) 従来治療に使用されている抗リューマチ剤。各種投薬形態物を作成するには、当業者に周知の助剤が使用される。

〔発明の実施例〕

以下、実施例により本発明を説明する。

実施例 1

患者：Lu 男性。

診断：10年間以上にわたる重症の慢性多発関節炎。手および足における変形。臨床検査の際運動性なし。従来疼痛の改善全くなし。

物質：ヒト白血球からのヒトγ-IFN製剤。

投与方法：皮下

療法：

治療日	投与量
1.	0.1×10^6 I.E.
2.	0.5×10^6 I.E.
3.	0.5×10^6 I.E.
4.	1.0×10^6 I.E.
5.	1.0×10^6 I.E.
8.	1.5×10^6 I.E.
9.	1.5×10^6 I.E.
10.	1.5×10^6 I.E.
11.	1.5×10^6 I.E.

結果：治療6日目に下肢における疼痛の相当な改善が示された。治療11日以降、患者は完全に疼痛がなくなった。患者は歩行可能となり、かつ階段を昇ることさえできた。打痛性は消失した。

実施例 2

患者：ZL 男性。

診断：両手における変形を伴なう重症の慢性多発関節炎。

物質：ヒト白血球からのヒトγ-IFN製剤。

投与方法：皮下

療法：

治療日	投与量
1.	0.5×10^6 I.E.
2.	0.5×10^6 I.E.
3.	0.5×10^6 I.E.

4.	0.5×10^6 I.E.
5.	0.5×10^6 I.E.
8.	1.0×10^6 I.E.
9.	1.0×10^6 I.E.
10.	1.0×10^6 I.E.

結果： 0.5×10^6 I.E.による治療で疼痛の相当な改善が示された。治療後4分間にわたり車椅子で歩行可能となり、治療9日目以降、2×20分間にわたり可能となった。患者は回復を自覚し、かつもはやコーチソンを必要としなかった。患者は治療開始後17日目に臨床から解放された。この患者は退院日に疼痛がなくなり、その運動性は確実となり、関節にはもはや打痛性が全く存在しなかつた。

実施例 3

患者：I.J. 女性。

診断：血清陰性のリューマチ性多発関節炎。

貧血。肝臓の局部的結節増殖。

物質：イー・コリからのヒトγ-IFN製剤。

投与方法：筋肉内

療法：

治療日	投与量
1.	100 μg活性物質
2.	100 μg活性物質
3.	100 μg活性物質
4.	100 μg活性物質
5.	100 μg活性物質
6.	100 μg活性物質
7.	100 μg活性物質
8.	100 μg活性物質
11.	175 μg活性物質
12.	175 μg活性物質
13.	50 μg活性物質
14.	50 μg活性物質

結果：治療初日目に疼痛が強くなった後、患者は治療4日目に初めて疼痛がなくなった。治療をさらに続けると、疼痛はさらに短時間となつた。間もなく患者には毎週1回10 μgの活性物質を筋肉内注射するようになった。患者はこの薬剤に良好に耐え、それ以来再び疼痛がなくなった。

11

実施例 4

患者：H.L.女性。

診断：4年間にわたる確実なリューマチ様関節炎。手、腰、膝、踝関節および指関節に疼痛あり。患者は金およびブレドニゾロンに対し感受性なし。

物質：イー・コリからのヒト γ -IFN製剤。

投与：皮下

投与量：治療開始として毎日2回の250 μ g。持続治療としての毎日2回の50 μ g。

結果：治療5日後に患者は疼痛がなくなり、かつ運動性が自由となつた。治療を持续すると、リューマチ様関節炎の臨床成績が相当に改善され、かつ持続された。患者は疼痛なしの状態を維持した。

実施例 5

患者：W.D.女性。

診断：1週間前から上腕肩甲骨関節周囲炎。

物質：ヒト白血球からのヒト γ -IFN製剤。

投与方法および療法：

1日1回皮下(0.5×10⁶I.E.)

結果：患者は数分間以内に疼痛がなくなつた。それ以来、疼痛はもはや生じなかつた。

実施例 6

患者：L.L.男性。

診断：座骨神経痛L₅／S₁右側。3週間前から骨多孔症。

物質：ヒト白血球からのヒト γ -IFN製剤。

5 投与方法：脊椎旁

療法：

	治療日	投与量
1.		0.5×10 ⁶ I.E.
21.		0.5×10 ⁶ I.E.

10 結果：最初の注射以後、患者は5日間にわたり第2回の注射から現在まで（最初の治療日から9ヶ月）疼痛がなかつた。

【発明の効果】

従来リューマチ症に適切な治療剤がなかつた

15 が、本発明の γ -インタフェロンを含有する治療剤により、例えば、リューマチ症患者に少量注射すると疼痛を持続的に除去すると共に、患者の運動性を著しく改善でき、また炎症性リューマチ症（実施例13）、関節外リューマチ症（実施例4および5）、および変性リューマチ症（実施例6）において治療上有効であり、種々のリューマチ症に

20 対して極めて優れた特効的な治療剤が提供出来る。